



Rec'd PCT/PTO 27 JAN 2005

KONGERIKET NORGE
The Kingdom of Norway

10/527151 #2
PCT/NO 03/00260

REC'D 27 AUG 2003

WIPO

PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Bekreftelse på patentsøknad
nr

Certification of patent application no

2002 3602

➤ Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 2002.07.29

➤ *It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 2002.07.29*

2003.08.01

Freddy Strømmen

Freddy Strømmen
Seksjonsleder

Line Reum

Line Reum



PATENTSTYRET
Styret for det industrielle rettsvern

BEST AVAILABLE COPY

PATENTSTYRET

29 JULI 2002

02-07-29*20023602 /6

AJJ/DLA

26.07.2002

E26153

AMI GO AS
Lysaker Torg 25
1366 Lysaker

Oppfinner(e):

Tomas Carlsson
Lesja Gjestgiveri
2665 Lesja
Norge

Fremgangsmåte for fremstilling av et proteinfritt produkt inneholdende frie aminosyrer og korte peptider, produkter fremstilt ved fremgangsmåten, samt anvendelse av disse produkter

Foreliggende oppfinnelse angir en fremgangsmåte for fremstilling av et proteinfritt produkt inneholdende peptider, frie aminosyrer og mineraler fra animalske/akvatiske råvarer, samt produktene og deres anvendelse som dyrefôr og/eller i produkter for den bioteknologiske, farmasøytiske og næringsmiddelindustrien. I tillegg kreves et
5 oljeprodukt som er et resultat av ovenfor nevnte fremgangsmåte.

Det er kjent i industrien å produsere peptider og aminosyrer gjennom syrehydrolyse, samt med bioteknologisk og eller kjemisk/teknisk, både naturlig og kunstig produserte, konsentrerte enzymer. Foreliggende oppfinnelse er en måte å bruke de naturlig
10 forekommende nedbrytningsenzymene fra animalske/akvatiske råvarer i en industriell prosess som gir et produkt med farmasøytisk, bioteknologisk eller næringsmiddelskvalitet.

Med farmasøytisk kvalitet menes produkter for intravenøs bruk og produkter som er
15 klassifisert som medisin for mennesker og dyr eller naturmedisin.

Med bioteknologisk kvalitet menes produkter som kan benyttes som for eksempel dyrkingsmedia eller katalysator i dyrking av celler, bakterier, fungi og alger.

20 Med næringsmiddelskvalitet menes produkter som brukes for humankonsumering enten som additiv eller som selvstendig produkt.

Oppfinnelsen kan naturligvis også brukes til å produsere fôrprodukter, i form av et additiv eller som selvstendige produkter.
25

Aminosyrer og peptider er velkjente innen farmasøytisk, naturmedisinsk og veterinærmedisinsk industri som bestanddeler i produkter som for eksempel intravenøs ernæring samt som spesialernæring for å lindre visse trauma. Her har det frem til nå hovedsaklig vært benyttet ekstrakter fra blodplasma og proteinhydrolysat produsert med
30 pankreas enzymer fra svin og kalv. Oppfinnelsen gir farmasøytisk industri en mulighet til å få tilgang til aminosyrer og peptider av en hittil ukjent kvalitet.

Aminosyrer og ultrakorte peptider anvendes også for bioteknologiske prosesser, for eksempel når et høypotent dyrkingsmedium skal produseres. Begrensende for all
35 industri som dyrker encellede organismer eller cellesubstrat fra høyere organismer er tilgangen på dyrkingsmedia med tilstrekkelig kvalitet. Brist eller høy pris er begrensende. Dessuten inneholder aminosyrer eller peptider fremstilt ved hjelp av

bioteknologiske metoder som regel veksthemmende stoffer som kan unngås ved hjelp av produktene fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Kombinasjonen av naturlige aminosyrespektra og biologiske sporenmner/mineraler som den beskrevne prosessen produserer gir et unikt produkt for produksjon av dyrkingsmedia for

5 bioteknologiindustrien. Dessuten kan teknikken resirkulere proteiner fra mange typer kulturer tilbake til aminosyrer og peptider som deretter kan brukes på nytt.

Peptider/aminosyrer brukes i næringsmiddelindustrien, som bindemidler, emulgatorer, smakstilsetning, og liknende. Anvendelsene er betydelige og stigende. De mest

10 anvendte peptider og aminosyrer i næringsmiddelindustrien stammer fra soyabønner og melk. Spesielt aminosyrer og peptider fra soya og melk er kjent for å forårsake allergene reaksjoner som kun kan unngås hvis man anvender en annen

peptid/aminosyresammensetning som ikke stammer fra disse kilder eller en peptid/aminosyresammensetning fra soya og melk som er tilstrekkelig modifisert for å

15 ikke forårsake disse reaksjoner. Således er det et stort behov for en fremgangsmåte som tilveiebringer en sammensetning av aminosyrer og peptider som også kan stamme fra soya og/eller melk, men som ikke forårsaker allergene reaksjoner. Produkter fra de fleste animalske kilder har ikke oppnådd samme grad av anvendelse, da det ikke finnes ekstraksjonsteknikker som kan bevare produktets funksjonalitet og samtidig fjerne

20 uønskede kvalitetsforringende komponenter som for eksempel salt og fett.

Innen fôrproduksjonen anvendes mange forskjellige sammensetninger av proteiner, peptider og aminosyrer som stammer fra ulike kilder. I fôrproduksjonen er sammensetning av peptidene, aminosyrene og proteinene også meget viktig ettersom

25 dyrenes vekstevne er avhengig av et balansert fôrinntak. Således er det også her et stort behov for en fremgangsmåte som tilveiebringer en hvilken som helst ønsket sammensetning som gir optimale vekstbetingelser for dyrene.

I det følgende brukes uttrykket "endogene" enzymer som et uttrykk for

30 proteinproduktets egne enzymer i motsetning til de "eksogene" enzymer som er fremmedenzymer som tilsettes råvaren av proteiner i forbindelse med en tradisjonell hydrolyse. Et eksempel på et "eksogent" enzym er "Deterzyme APY", som er en bakteriell protease (E.C.3.4.21) fremstilt ved kontrollert fermentering av *Bacillus alcalophilus* og som kan kjøpes fra flere leverandører. Med endogene enzymer menes

35 også enzymer ekstrahert fra andre lignende naturlige enzymvarer/råvarer, fortrinnsvis fra kaldblodige dyr.

Benevningen hydrolysat er i den nedenstående teksten brukes som en betegnelse på de råvarer som befinner seg under prosessering, dvs. at den tempererte og pH-justerte blandingen av råstoff og vann utgjør hydrolysatet.

5

Det foreligger flere patenter innenfor oppfinnelsens område som for eksempel RU 2103360 som beskriver et næringsmedium for kultivering av eukaryotceller og en fremgangsmåte for fremstilling av et hydrolysat fra fiskeslo som fremstilles ved proteolytisk hydrolyse. Denne hydrolyseprosessen gjennomføres med en høy pH justert med natriumhydroksid, ved hjelp av temperaturinaktivering, filtrering og tørking hvor fiskeavfallet blandes med destillert vann i forhold 1:1, og ved at hydrolysen skjer ved en temperatur på +40° - +42°C inntil man oppnår en vektandel på aminonitrogen på 5,5-6,5% og en vektandel på frie aminosyrer på 50-60%.

15 Dessuten er det i SU 1755417 kjent en fremgangsmåte for produksjon av hydrolysater av fiskeråvaren i en fermentor hvor det tilsettes et fermenteringspreparat fulgt av filtrering og tørking av produsert hydrolysat, hvor man anvender ikke-knust råvare som mater periodisk inn i fermentoren.

20 RU 1559466 beskriver en fremgangsmåte for produksjon av hydrolysater, som forutsetter knusing av fiskeprodukter eller avfall fra foredling av disse, blanding med vann, oppvarming av blandingen, tilsetning av et proteolytisk fermenteringspreparat, fermentering, filtrering og tørking, hvor blandingen av råstoff og vann skjer i forhold 2:1 - 1:1, oppvarmingen skjer opptil +40°- +45°C, mens fermentasjon foretas over 0,5 – 2,5 timer ved bruk av det eksogene enzymet protosubtilin G3x.

Ytterligere nevnes FR 2168259 som beskriver en enzymatisk hydrolyse av fiskeproteiner som utføres ved å knuse fersk fisk til en fin masse uten å tilsette vann. Det tilsettes eksogene enzymer og massen hydrolyseres i ca 15 timer avhengig av ønsket løselighet. Produktet stabiliseres i 5-20 minutter ved +90°- +100°C, filtreres, pasteuriseres og sentrifugeres. Prosessen gir produkter med høy næringsverdi.

Som vist over er det kjent forskjellig teknikk for frigjøring av proteiner, peptider og aminosyrer fra fisk som er egnet for næringsmiddelproduksjon. Dessuten er det kjent å fremstille også olje/fett fra råmaterialet fra plante- så vel som animalske råvarer.

35

Formålet med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en fremgangsmåte for å produsere et proteinfritt proteinhydrolysat basert på bruk av naturlige enzymer uten tilsetning av noen ikke naturlige stoffer. Dette i motsetning til andre metoder som bruker enzymer fra mange forskjellige kilder slik som fra bakteriekulturer o. lign.

5

Videre er det et formål at prosessen skal tilveiebringe et produkt som er helt fritt for protein og DNA samt andre allergene stoffer og at dette skjer uten at det går ut over utnyttelsen av råvarene. Metoden skal også redusere fett i sluttproduktet til et så lavt nivå at ulempene med bruk av fiskeråvarer elimineres. Det skal tilveiebringes et produkt som skal kunne brukes innenfor mange forskjellige områder hvor fettinnholdet i produkter produsert med kjente metoder har begrenset eller umuliggjort dette.

10

Videre er det et formål å utnytte råvarene mest mulig fullstendig og at belastningen av miljøet i forbindelse med produksjonen blir lavest mulig.

15

Således er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for utvinning av peptider/aminosyrer og olje/fett fra proteinholdige råvarer kjennetegnet ved at den innbefatter følgende trinn:

- a. å kverne råvarene;
- 20 b. å oppvarme den kvernedede råvarene til temperaturer i området fra 40 - 62°C, fortrinnsvis 45 - 58°C;
- c. å eventuelt før og/eller etter oppvarmingen separere olje/fett fra råvarene for å oppnå et første oljeprodukt;
- d. å tilsette vann, hvor vannet holder tilnærmet eller samme temperatur som råvarene, hvor pH-verdien av vannet er justert ved tilførsel av kalsium;
- 25 e. å hydrolysere råvarene med endogene enzymer for å fremstille et hydrolysat;
- f. å eventuelt under hydrolyseringen tilsette en pH-regulator for å opprettholde den ønskede pH-verdi i hydrolysatet;
- 30 g. å oppvarme hydrolysatet til 75-100°C, fortrinnsvis 85-95°C;
- h. å fjerne større partikler fra hydrolysatet, inklusiv ikke hydrolyserte proteiner, som kan returneres til hydrolyseringen;
- i. å eventuelt skille ut fett/olje, for å oppnå et andre oljeprodukt;
- j. å koagulere proteinene;
- 35 k. å fjerne de koagulerte proteinene;
- l. å eventuelt skille ut fett/olje, for å oppnå et tredje oljeprodukt;
- m. å eventuelt konsentrere de resterende aminosyrer og korte peptider og

- n. å eventuelt tørke konsentratet, for å oppnå tørre korte peptider og aminosyrer.

Foretrukne trekk ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen fremgår fra medfølgende krav 2-5.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen frembringer et peptid og aminosyre produkt med lavt fettinnhold, fortrinnsvis mindre enn 0,1%. Videre inneholder produkter naturlige mineraler med biologisk opphav. Saltinnholdet i produktet er mindre enn 1%.

10

Oppfinnelsen innbefatter også en anvendelse av en av fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et bioteknologisk, et farmasøytisk, et næringsmiddelprodukt samt et forprodukt.

15

Oppfinnelsen omfatter også anvendelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstilling av hydroksyapatitt.

Ytterligere er det tilveiebrakt aminosyrer/peptider fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at de ikke inneholder allergener og DNA-spor.

20

Der er også tilveiebrakt en olje fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at den ikke inneholder allergener og DNA-spor.

25

Endelig er det tilveiebrakt hydroksyapatitt fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at det ikke inneholder allergener og DNA-spor.

30

Foreliggende oppfinnelse løser på den ene siden problemet med å tilveiebringe produkter med et bredt kvalitetsspekter som varierer fra anvendelse for næringsmiddelproduksjon til anvendelse i produkter som skal tilfredsstille kravene til for eksempel legemidler og lignende.

Foreliggende oppfinnelse løser dette problemet ved å anvende råvarenes egne endogene enzymer og tilpasse produksjonsbetingelsene til disse enzymer.

35

Prosessen skiller seg vesentlig fra tidligere kjente hydrolyseprosesser ved at denne ((kan) foregå(r)):

- uten tilsetninger, som for eksempel kloroform, for å unngå uønsket bakterievekst;
- uten tilsetning av natriumhydroksid
- med mulighet for varm- og kaldutvinning av olje/fett;
- 5 - med mulighet til å styre spektret av frie aminosyrer og peptider i sluttproduktet ved valg av råvarer for prosessen gjennom valg av spesifikke råvarer;
- med mulighet at styre resultatet av prosessen, med hensyn til aminosyre- og peptidsammensetning ved hjelp av de anvendte prosessparametrene så som temperatur og pH
- 10 - uten tilsetning av syre under hydrolyseringsprosessen;
- med fleksible kombinasjon av ulike råvarer;
- ved hjelp av tilpasset konsentrering for utskilling av produktfraksjoner; og ved at den
- ved fjerning av proteiner og store peptider som ikke er fullt hydrolyserte
- 15 gjennom koagulering
- ved filtrering og utfelling av de koagulerte proteinene
- ved hjelp av tilpasset konsentreringsteknikk;
- ved at den bruker kortere tid ved hydrolyse, og
- gir et produkt som inneholder mineraler og sporemnner med biologisk opphav.

20

Fremgangsmåten som er beskrevet er en naturlig hydrolyse av proteiner med det formål å oppnå tørkede sluttprodukter med ulike sammensetninger av korte peptider og frie aminosyrer. Prosessen gir ferdige produkter som inneholder fra 5% til 100% frie aminosyrer uten proteiner og lange peptider. I tillegg beskriver metoden utvinning av

25 oljer/fett.

Valg av prosessparametere vil avgjøre hvilket sluttprodukt man får. På denne måten kan man tilpasse produkter til kundens ønsker.

- 30 Figur 1 viser en utførelsesform av anlegget i hvilken man anvender hydrolyseringsprosessen ifølge oppfinnelsen.

En utførelsesform av fremgangsmåten er her forklart nærmere med henvisning til figur 1.

35

Råvarene pumpes inn fra tank 1 igjennom et kvernesystem 2 som gir ønsket finfordeling av råvarene.

Olje/fett fra råvarene kan utvinnes før enzymprosessen settes i gang. Her kan det for eksempel anvendes en kaldutvinning av oljen. Det er og tenkbart ikke å skille ut oljen før enzymering, da pumpes råvarene direkte til varmeveksleren 5 i "by pas"-strøm D.

5 Kaldutvinning av olje kan skje ved at man;

1. Sentrifugerer råvarene og skiller ut flytende og faste partiklar i to ulike fraksjoner ved eksempelvis en dekanter-sentrifuge 3.
2. Separere ut oljen; med for eksempel en separator 4 fra den flytende fasen strøm A.
- 10 3. Den faste fasen strøm B og den tunge fasen fra separeringen blandes og pumpes til fermentoren strøm C.
4. Oljefasen fra separeringen strøm D kan pumpes til tank 10 via et sterilfilter 9 og dermed ikke behøver den ikke raffineres ytterligere for å oppnå næringsmiddelkvalitet.

15

Varene kan pumpes via enten en "inline" kontinuerlig varmeveksler 5, alternativt i en batch arbeidende varmeveksler, til fermenteringstanken 6. Fermenteringstanken kan også brukes for oppvarming hvis det ikke gjøres i en varmeveksler før det pumpes inn. Til råvarene tilsettes temperert og pH justert vann strøm E som varmes via en

20 varmeveksler 8 tilnærmet den temperatur som fermenteringen skal foregå i. Justeringen av pH gjøres fortrinnsvis gjennom at vannet bringes passere en filtermasse som avgir kalsium 7. Temperatur og pH overvakes med følere 11 eller på annen måte, i fermentoren mens prosessen foregår. Justering til ønsket pH skjer under prosessen med fortrinnsvis benmel eller kalsium som tilsettes fra lagertank 2. Nitrogen kan og brukes

25 for justering av pH under prosessen 13. Når enzymeringen er klar varmes hydrolysatet opp fortrinnsvis via en varmeveksler 14 så at enzymene inaktiveres.

Hvis hydrolysatet inneholder bein eller andre faste partikler fjernes disse fortrinnsvis med en siktanordning 15. De faste partiklene strøm F kan med hjelp av flotering 16 skilles i to eller flere fraksjoner. Den tunge fraksjonen 17 består av ben (hydroksyapatit)

30 som kan tørkes og/eller brukes før pH justering strøm H. De lette fraksjonene strøm G er i hovedsak proteiner som ikke er hydrolyserte. Disse kan tas tilbake til kvern 2 og brukes som råvare for ny hydrolyse eller tas ut som biprodukt.

Fettet som er tilbake etter første fettfraskilling separeres fra med til eksempel en

35 trefaseseparator 18. Oljen/fettet strøm I filteres i filteret 19 og kan tas til tank 20 for eventuell senere videreforedling eller lignende.

Hydrolysatet strøm J føres til en blandetank 21 der syre (fortrinnsvis fosforsyre) tilsettes 22 til pH < 5. Deretter tilsettes kalsium 23 så at lange peptider og proteiner flokker sammen. Proteinene og kalsium/kalsiumfosfat fraskilles med en sentrifuge 24 og føres til en tank 25. Dette biprodukt kan tørkes på høy temperatur slik at alle proteinrester
5 brennes bort.

Det protein frie hydrolysatet strøm K konsentreres fortrinnsvis i en vakuuminddamper 26. Kondensatet strøm L kan brukes som tilsetningsvann strøm E. Konsentratet strøm M kan tørkes på en spraytørke 27 fortrinnsvis av Filtermate® type. Alternativt kan
10 konsentrat tas ut som flytende produkt strøm N.

Med mindre annet er anført er alle prosent angivelser her i vektprosent.

I det følgende beskrives prosessen nærmere:

15

1) Råvarer:

Råvarene til prosessen kan bestå av proteinvare fortrinnsvis fisk, fiskeprodukter, skalldyr, krepsdyr, bløtdyr og biprodukter fra fisk /fiskeindustri for eksempel fiskeslo
20 og andre marine organismer fra ferskvann og saltvann. De ulike råvarene kan anvendes enkeltvis eller i kombinasjon av produkter som inneholder "enzymvare" og "proteinvare". "Enzymvaren" er råmaterialet som inneholder de endogene enzymer i tilfredsstillende mengde og kvalitet. "Proteinvaren" beskriver råmaterialer som ikke innbefatter de endogene enzymene i tilfredsstillende mengde og kvalitet og som således
25 må suppleres med enzymvaren for å kunne gjennomføre enzymbehandlingen. I noen tilfeller kan enzymvaren være identisk med proteinvaren. Tidligere kjente prosesser beskriver en sammensetning mellom slo og proteinvare som forholdet 1:1. Metoden beskrevet her gjør det mulig å variere dette forholdet for å oppnå det ønskete resultat i sluttproduktet.

30

Råvarene fyller de lovbestemte kravene for utgang produkter for fremstilling av næringsmidler. Råvarene har tidligere gjennom lovverket og definisjoner blitt klassifisert som avfall. Gjennom gode logistikk- og prosessrutiner vil man her være i stand til å få råstoffet godkjent som næringsmiddel. Det muliggjør produksjon i
35 industriell målestokk og anvendelse av produktet i næringsmiddel- og/eller farmasøytisk industri.

2) Forbehandling av råvarene:

Råvarene pumpes inn fra tank, igjennom et kvernesystem, som gir ønsket finfordeling av varene. Kverningen gir større arbeidsoverflate for enzymene samt at den raskere frigjør råvarenes enzymer.

Olje/fett fra råvarene kan utvinnes før enzym-prosessen settes i gang. Her kan for eksempel anvendes en kaldutvinning av oljen.

Kaldutvinning av olje kan skje ved at man;

1. Sentrifugerer råvarene og skiller ut flytende og faste partiklar i to ulike fraksjoner.
2. Separere ut oljen fra den flytende fasen.
3. Den faste fasen og den tunge fasen fra separeringen blandes og pumpes til fermentoren
4. Oljefasen fra separeringen viderebehandles til ferdig kundespesifikt produkt som ikke behøver videreraffinering for å oppnå næringsmiddelkvalitet.

Varene kan pumpes via enten en "inline" kontinuerlig varmeveksler, alternativt i en batch arbeidende varmeveksler, til fermenteringstanken. Fermenteringstanken kan også brukes for oppvarming hvis det ikke gjøres i en varmeveksler før det pumpes inn.

Ønsker man å blande ulike typer råvarer i et visst forhold, kan disse produktene pumpes inn og blandes samtidig. Mengden av ulike råstoff kan styres ved hjelp av flowmålere og/eller nivåkontroll i fermentoren.

Dessuten er det mulig at råvarene ikke kvernes eller at råvarene kan unngå å blandes samtidig, ved at en kjent mengde av råstoff A pumpes inn på en blandetank og en kjent mengde av råstoff B deretter pumpes inn på samme tank.

Råvarene ønskes varmet til en temperatur som er gunstig for de enzymer man ønsker skal være mest aktive i hydrolyseprosessen. Dette temperaturintervallet strekker seg fra 40 – 62 °C. Optimalt intervall vil være 45 - 58 °C i de fleste tilfeller.

Ved bruk av forskjellige temperaturer vil man kunne oppnå virkning av forskjellige enzymer og styre aminosyresammensetningen.

Oppfinnelsen gir muligheter til underveis i prosessen, etter hydrolyse, utvinning/separering av fett å oppnå et lavt fettinnhold i sluttproduktet.

Fettutskillingen kan gjøres før og/eller etter koagulering av proteinene. Typisk fettinnhold i sluttproduktet er mindre en 0,1 % i tørket peptid/aminosyreprodukt.

For fettutskilling kan det benyttes velkjente teknikker som dekantering, separering og
5 /eller kjemiske metoder.

3) Hydrolyseprosess:

Blandingen av oppvarmede råvarer pumpes over i hydrolysekar/tanker. Til denne
10 blandingen tilsettes temperert og pH justert vann som holder tilnærmet den temperatur som fermenteringen skal foregå i. Mengden vann vil kunne varieres i forhold til råstoff og ønsket resultat. I tidligere kjent teknikk ble det benyttet en mengde tilsatt på 50% av total mengde, dvs 50% råstoff og 50% vann. Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvender man mindre vann, på grunn av en optimering av tilgjengelig enzym- og
15 proteinvare samt temperatur og pH. Denne metoden benytter fra 10% til 40% tilsatt mengde vann. Optimalt vil vanntilsetningen ligge mellom 20 og 30%. Mindre tilsetning av vann betyr at konsentrasjonen av korte peptider og frie aminosyrer i hydrolysatet etter hydrolyse blir høyere, med besparing i prosess- og energikostnader som følge.

20 Hydrolysatet holdes i fermenteringstank/er under konstant omrøring og pumping. Hensikten med dette er å forbedre hydrolyseprosessen. En unnlattelse av å røre/pumpe hydrolysatet under prosessen vil kunne føre til å man ikke har god nok kontroll med pH, temperatur og selve prosessen. Hydrolysen vil kunne forløpe ulikt i deler av hydrolysatet og en del av enzymene vill kunne gå tapt .

25 For å kontrollere hvor langt hydrolysen er kommet, analyseres aminobundet nitrogen. Analysen kan skje enten direkte i fermentoren ved hjelp av automatisk utstyr eller på produksjonslaboratorium ved hjelp av velkjente teknikker, som formoltitrering eller liknende. Tidsbruken på prosessen vil kunne variere fra 1- 4 timer. Hydrolyseprosessen
30 stoppes når andelen frie aminosyrer ikke lengre øker i hydrolysatet, dette for å unngå at uønsket ammoniakk skal dannes, hvilket resulterer i reduksjon av utnyttelsesgraden av råvarene.

Det er en forutsetning for prosessen at det er alkaliske enzymer som virker. Det er
35 derfor viktig at pH > 7,00 ved hydrolysen. pH intervallet vil ligge mellom 7,00 og 8,50. Optimal hydrolyseprosess oppnås ved pH 7,60 til 8,20. Hvis pH >8,1 men <8,4 under hele prosessen ekskluderes fritt tryptofan fra aminosyrespektret omvent hvis pH <7,6

men $>7,4$ under hele prosessen maksimeres tryptofan til alt som er mulig at utvinne, hvilket bestemmes av råvaren. Hvis temperaturen $<46^{\circ}\text{C}$ men $>44^{\circ}\text{C}$ og pH er $<7,8$ men $>7,7$ under hele prosessen oppløses kollagen ikke i større grad men fås som faste partikler.

5

Til pH-justering av hydrolysatet kan benyttes forskjellige baser, som for eksempel benmel fra tidligere utvunnet fiskeben, kalsium og nitrogengass, men ikke natriumhydroksid.

- 10 Ved den foreliggende oppfinnelsen tilsettes ikke HCl i prosessen. Årsaken til dette er det dannes uønskete salter. Likeledes vil kostnadene ved produksjonen bli høyere. Kjent teknikk beskriver dessuten kloroform som en tilsetning for å hindre bakterievekst. Dette er ikke benyttet i denne prosessen på grunn av den korte hydrolysetiden. Å benytte kloroform i industriell skala er ikke ønskelig, men mulig.

15

For å stoppe hydrolysen brukes forhøyet temperatur fortrinnsvis over 70 grader. Denne temperaturøkningen gjøres fortrinnsvis med "inline" varmeveksler.

- Koagulering av restproteiner gjøres med hjelp av lav pH. Da kan det benyttes
20 fosforsyre som tilsetning for å senke pH til ønsket nivå, fortrinnsvis mellom pH 3,2-5,5. Etter en tilsetning av fosforsyre eventuelt i kombinasjon med oppvarming/nedkjøling vil man være i stand til å fjerne proteiner og peptider fra hydrolysatet. Også andre metoder for denaturering av proteiner og peptider kan selvfølgelig anvendes. For eksempel kan elektrisk denaturering brukes.

25

- For å segmentere innholdet av frie aminosyrer og korte peptider fra denaturerte proteiner og lange peptider, kan man benytte kjente filtreringsteknikker. Fraksjonenes ulike tyngde og forskjellig kjemiske egenskaper kan også benyttes for å skille dem ved separering. For å lette dette kan man benytte kalsiumfosfat, kalsiumhydroksid og
30 kalsiumklorid. Dette gjør at proteiner og peptider "klumper seg sammen". De blir dermed lettere å skille ut, på grunn av økt densitet. Mengden av tilsatte kjemikalier vil variere, både avhengig av innholdet av proteiner, peptider, samt innholdet av andre bufferstoffer i løsningen.

35

4) Konsentrering:

Det ferdige hydrolysatet ønskes så konsentrert. Dette gjøres for å fjerne vann før tørkeprosessen slik at kapasiteten på tørkingen blir utnyttet maksimalt. En for-konsentrering før tørking opp til 70% TS (tørrestoff) er mulig innen krystallisering inntreffer.

- 5 En destillasjonsprosess av typen vakuuminndampning er godt egnet til dette formålet, men hvilke som helst andre former for konsentreringsanordninger kan brukes. Vakuumkinndamperen konsentrerer vesken på lav temperatur, slik at man ikke ødelegger peptider/aminosyrer.
- 10 Inndampning kan skje ved temperaturintervallet 50 - 85 °C. Optimalt vil det være fra 65 - 70 °C. Ytterligere kan hydrolysatet kjøres direkte til tørking (se punkt 6) uten å gå veien om konsentrering eller at konsentrering foregår på andre måter enn ved koking eller vakuuminndampning. Ulike typer av filtrerings-/membran-/osmoseanlegg vil også kunne utføre dette.

15

5) Tørking/Granulering:

- Etter konsentrering kan produktet tørkes hvis man ønsker det, men det kan også tenkes at produktet foreligger i flytende form eller i hvilken som helst tilstand mellom tørr og flytende form. Tørking gjør at produktet blir mer lagringsstabil, og det forenkler logistikk og håndtering. Måten produktet tørkes på er avgjørende for sluttresultatet. Et ferdig peptid-/aminosyreprodukt vil kunne være svært hygroskopisk og er derfor en utfordring med tanke på denne prosessen. For å gjøre produktet lettere håndterbart ønskes et granulert produkt.

25

I en utførelsesform av denne prosessen foregår tørking og granulering i to trinn men det kan selvfølgelig også tenkes ettrinnsprosesser. Først trinn omfatter tørking til pulver i spraytørke eller lignende, med kjølesteg og deretter granulering ved hjelp av tilsetning av flytende hydrolysat.

30

- Granulering foregår ved at man "bygger" granulater ved at pulver/produkt holdes i kraftig bevegelse ved hjelp av mekanisk roterende blader som gir produktet en fluid-bed lignende karakter. Deretter sprayeres konsentratet/hydrolysatet inn i denne massen. Dette gjør at man gradvis bygger granulater. Det hele er en kontinuerlig prosess. På slutten av granuleringsprosessen blåses tørket kald luft over/igjennom granulatet. Granulatet siktes og ønsket fraksjon tas ut. Gjenværende finstoffer tilbakesføres for videre

35

granulering. For store granulater kvernes og siktes på nytt. Eventuell nydannede finstoffer går i retur til granulering.

5 Som tidligere nevnte er den ovenfor skisserte tørke- og granuleringsprosessen kun en av utførelsesformene som kan anvendes for å tørke og granulere produktene av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen og enhver fagmann på området vil forstå at hvilke som helst andre egnete metoder kan anvendes for å oppnå et liknende resultat.

10 Selvfølgelig er det også mulig å blande ulike additiver blandes inn i produktet, fortrinnsvis ved granuleringstrinnet.



P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for utvinning av peptider/aminosyrer og olje/fett fra en eller flere
5 proteinholdige råvarer k a r a k t e r i s e r t v e d a t
den innbefatter følgende trinn:

- a. å kverne råvarene;
- b. å oppvarme den kvernedede råvarene til temperaturer i området fra 40 - 62°C,
fortrinnsvis 45 - 58°C;
- 10 c. å eventuelt før og/eller etter oppvarmingen separere olje/fett fra råvarene for
å oppnå et første oljeprodukt;
- d. å tilsette vann, hvor vannet holder tilnærmet eller samme temperatur som
råvarene, hvor pH-verdien av vannet er justert ved tilførsel av kalsium;
- e. å hydrolysere råvarene med endogene enzymer for å fremstille et
15 hydrolysat;
- f. å eventuelt under hydrolyseringen tilsette en pH-regulator for å opprettholde
den ønskede pH-verdi i hydrolysatet;
- g. å oppvarme hydrolysatet til 75-100°C, fortrinnsvis 85-95°C;
- h. å fjerne større partikler fra hydrolysatet, inklusiv ikke hydrolyserte proteiner
20 som eventuelt kan returneres til hydrolysen;
- i. å eventuelt skille ut fett/olje, for å oppnå et andre oljeprodukt;
- j. å koagulere proteinene;
- k. å fjerne de koagulerte proteinene;
- l. å eventuelt skille ut fett/olje, for å oppnå et tredje oljeprodukt;
- 25 m. å eventuelt konsentrere de resterende aminosyrer og peptider og
n. å eventuelt tørke konsentratet, for å oppnå tørre peptider/aminosyrer.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
30 vannet som tilsettes i trinn d utgjør 10-40 %, fortrinnsvis 20-30% vann av en total
reaksjonsblanding.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den
35 forgår som en lukket prosess.

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at pH-regulatoren i trinn f er nitrogengass, kalsium eller benmel.

5

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den videre omfatter å oppdele de større partiklene fra trinn h i bendeler for fremstilling av hydroksyapatitt, proteinrester som kan returneres til hydrolysen og andre faste partikler.

10

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at peptid og aminosyre produktet har et fettinnhold på <0,1% og et saltinnhold på <1%.

15

7.

Anvendelse av en av fremgangsmåten ifølge krav 1 for fremstilling av et farmasøytisk produkt.

8.

20

Anvendelse av en av fremgangsmåten ifølge krav 1 for fremstilling av et næringsmiddelprodukt.

9.

Anvendelse av en av fremgangsmåtene ifølge krav 1 for fremstilling av et fôrprodukt.

25

10.

Anvendelse av en av fremgangsmåtene ifølge krav 1 for fremstilling av et bioteknologisk produkt.

30

11.

Anvendelse av fremgangsmåten ifølge krav 1 for fremstilling av hydroksyapatitt.

12.

35

Aminosyrer/peptider fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 1, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at de ikke inneholder allergener og DNA-spor og at fettinnholdet er < 0,1% og har et saltinnhold på <0,5 vekt-%.

13.

Hydroksyapatitt fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 5 k a r a k -
t e r i s e r t v e d at det ikke inneholder allergener og DNA-spor.

5

14.

Olje, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er det første oljeprodukt
fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 1, er kaldpresset og av næringsmiddelkvalitet.



